

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORLED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-41467

(43) 公開日 平成7年(1995)2月10日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D 263/44				
C 0 8 G 69/10	NRN			
69/42	NRJ			

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平5-186085

(22) 出願日 平成5年(1993)7月28日

(71) 出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72) 発明者 岩月 誠

東京都中央区京橋1-15-1 味の素株式会社内

(72) 発明者 飯塚 靖子

群馬県山田郡大間々町大字大間々766-13

(72) 発明者 大屋 正尚

群馬県桐生市天神町3-10-21

(74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

(54) 【発明の名称】 新規N-カルボキシアミノ酸無水物

(57) 【要約】

【構成】 S-フェニルカルバモイル-N-カルボキシシステイン無水物自体及びこれを単量体として単独縮重合又は他のN-カルボキシアミノ酸無水物との共縮重合に付することを特徴とするシステインを含む高分子量ポリペプチドの製造法。

【効果】 システインの単独重合体又は共重合体を一般的な化学反応装置と技術とによりしかも安価に工業的に製造できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 S-フェニルカルバモイル-N-カルボキシシステイン無水物。

【請求項2】 請求項1記載の無水物を単独縮重合又は他のN-カルボキシ- α -アミノ酸無水物と共縮重合させることを特徴とするシステインを含む高分子量ポリペプチドの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規物質であるS-フェニルカルバモイル-N-カルボキシシステイン無水物自体及びこれを単独縮重合反応又は他のN-カルボキシ- α -アミノ酸無水物との共縮重合反応に付することを特徴とするシステインを含む高分子量ポリペプチドの製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】側鎖に官能基を有するアミノ酸残基を含むペプチドを合成する場合、アミノ酸の側鎖の官能基を保護しておいてそのN-カルボキシ無水物(NCA)とし、これを縮重合反応に付してペプチド結合を形成し、目的とするアミノ酸残基を全部導入し終わった段階で保護基を除去する方法が一般に行なわれている。

【0003】システインの場合、そのスルフヒドリル基(SH)の保護基としてはベンジル基(Bzl)及びカルボベンゾキシ基(Z)が最もよく用いられている。従って、従来システインを含む高分子量ポリペプチドを合成する方法としては、システインの側鎖のスルフヒドリル基をベンジル基またはカルボベンゾキシ基で保護しておいてそのN-カルボキシ無水物を合成し、これを単独縮重合または共縮重合した後に弗化水素または液体アンモニア/金属ナトリウム中で保護基を除去している。

【0004】しかしながら、このような方法における諸反応は危険な反応であるためにいずれも特殊な装置を必要とし、その操作には熟練と高い技術が必要となるために製品は高価なものとならざるを得ない。

【0005】これらの課題を解決するために、本発明者は、さきに、エチルカルバモイル基によりシステインのSH基を温和な条件で保護し、常法によりNCAを合成し、これを単独縮重合または共縮重合させたのち、その側鎖のSH保護基をナトリウムエチラートで除去できることを見出し、この知見に基づくシステインを含む高分子量ポリペプチドの製造法を発明した(特開平5-43560)。

【0006】しかしながら、このような製造法によってもなお、システインをエチルカルバモイル基で保護するためにエチルイソシアネートとシステインを反応させるが、エチルイソシアネートは工業的に製造されておらず、容易に入手できない；更に保護基を外し、システイン単独重合体または共重合体とする場合、脱保護反応の確認を元素分析を主体に行うため、製造工程管理が複雑

である；といった問題が残し、更なる改良法が望まれている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上述のような欠点を免れた、システインを含む高分子量ポリペプチド(システインの高分子量ホモポリマー又はコポリマー)の合成法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は、前記の課題の解決を求めて鋭意研究の結果、システインのSH基はエチルイソシアネートによらずとも、その代りに工業的に安価に入手できるフェニルイソシアネートによっても極めて温和な条件で保護することができること、及びこのような保護基でSH基を保護したシステインを、常法により、そのNCAに変えた後に重合反応に付して得られるSH保護ポリペプチドはその側鎖からそのような保護基を極めて温和な条件で定量的に除去できること、しかも保護基のフェニル基は紫外線および赤外光の吸収で特異な吸収波長を示すので分析が容易となること、を見出し、このような知見に基いて本発明を完成した。

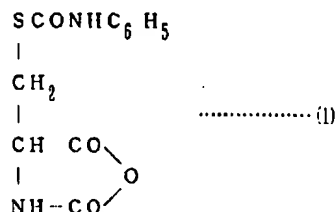
【0009】本発明の方法は、保護基の導入及びその除去が温和な条件で行ない得る点などにおいてシステインを含む高分子量ポリペプチドの工業的製造法として極めて優れている。

【0010】以下、本発明を詳述する。

【0011】本発明の第1は、S-フェニルカルバモイル-N-カルボキシシステイン無水物に関する。この化合物は、式(1)の構造を有し、前述のように新規物質である。

【0012】

【化1】



【0013】S-フェニルカルバモイルシステイン($\text{HOOC}(\text{H}_2\text{N})\text{HCCH}_2\text{SCONHC}_6\text{H}_5$)は、システイン($\text{HOOC}(\text{H}_2\text{N})\text{HCCH}_2\text{SH}$)とフェニルイソシアネート(OCNC_6H_5)から比較的簡単に合成可能で、さらに酸性下で極めて安定なことから安価に入手できる。

【0014】本発明に係る新規物質S-フェニルカルバモイル-N-カルボキシシステイン無水物は、例えば、アミノ酸をジオキサン、テトラヒドロフランなどの不活性溶媒に懸濁してホスゲン(COCl_2)を作用させるというN-カルボキシアミノ酸無水物(NCA)の一般的製法に従って上記S-フェニルカルバモイルシス

テインにホスゲンを作用させることによって製造することができる。

【0015】本発明の第2は、S-フェニルカルバモイル-N-カルボキシシステイン無水物（S-フェニルカルバモイルシステインNCA）を単量体としてこれのみで縮重合反応に付する（単独縮重合）か又はこれと他のN-カルボキシー- α -アミノ酸無水物（他のアミノ酸のNCA）とを縮重合に付する（共縮重合）ことを特徴とするシステインを含む高分子量ポリペプチドの製造法に関する。

【0016】一般にNCAは、ベンゼン、トルエン、クロロベンゼン、ジクロロエタン、ピリジン、ジオキサンなどの不活性溶媒中で、微量の水、アルコール、アミン、水酸化アルカリなどの重合開始剤の存在下に加熱すると、二酸化炭素（CO₂）を放出して縮重合することは知られている。又、重合度はアミノ酸の種類、溶媒、重合開始剤によって異なるが、一般的に無水物の濃度が低いほど、又反応温度の低いほど高分子量のポリアミノ酸が得られることも知られている。以上、化学大辞典編集委員会編「化学大辞典2」575頁（共立出版（株）1960年発行）参照。

【0017】本発明のS-フェニルカルバモイルシステインNCAの縮重合も上述の一般法に準じて行なわれる。

【0018】すなわち、重合溶媒としては、1, 2-ジクロロエタンなどのハロゲン化炭化水素、ベンゼンなどの芳香族炭化水素、ピリジンなどの複素環式化合物、ジオキサン、テトラヒドロフランなどの環状エーテル、アセトニトリルなどのニトリル類及び酢酸エチルなどのエステル等の非プロトン系有機溶媒が挙げられる。この使用量は、無水物1g当り5~100ml、好ましくは10~40mlの割合が実用的である。

【0019】重合開始剤としては、アミン類及びナトリウムアルコラート類等のアルカリが挙げられる。この使用量は、無水物1mol当り1/10~1/400 mol、好ましくは1/50~1/250 molである。

【0020】S-フェニルカルバモイルシステインNCAを溶媒に溶解し、これに重合開始剤を加えた混合物を0~50℃に数時間乃至数日間保持することにより単独縮重合が生じ、高収率でポリ-S-フェニルカルバモイルシステインが得られる。

【0021】S-フェニルカルバモイルシステインNCAと共縮重合させるべき他のアミノ酸のNCAには特別の制限はなく、共重合体の用途に応じて適宜選択するとよい。原料の単量体N-カルボキシアミノ酸無水物（NCA）として、S-フェニルカルバモイルシステインNCA単独ではなく、これと他のアミノ酸のNCAとを併用すること以外は、溶媒、重合開始剤、反応条件等単独縮重合の場合と同様でよい。

【0022】縮重合反応系からの生成ポリペプチド（ポ

リマー）の分離にも特別の制限はなく、反応系をそのまま濾過してポリマーを濾取するとか、ポリマーの非溶媒を加えてポリマーを沈殿させるとか等適宜公知の方法によるとよい。分離したポリマーは、必要により、例えば減圧で十分乾燥する。

【0023】本発明において高分子量ポリペプチドという場合の高分子量とは粘度法により測定される粘度平均重合度50以上を意味する。

【0024】本発明の方法により得られる、フェニルカルバモイル基をSHの保護基として側鎖に持つポリペプチド（ホモポリマー又はコポリマー）から保護基を外すことは極めて温和な条件で行なうことができ、一般的な化学反応装置と技術により取扱え、例えば、ポリマーを安価な低級アルコールに分散し、これに安価なナトリウム低級アルコラートの低級アルコール溶液を加えて単に室温で放置することなどの安価な塩基性溶液中室温で行なうことができる。

【0025】このような脱保護法によれば、従来の弗化水素による場合と異なり、SH基の強い酸化によるスルホキシド化は起らないが、ポリマー中システイン成分が多い場合はSH基の弱い酸化により分子間架橋が起り、ポリマーは水にもその他の溶剤にも不溶化することがある。

【0026】上のようにして、脱保護したシステインを含む高分子量ポリペプチド（システインのホモポリマー及びコポリマー）は、例えば、生体内ゲル、毛髪保護剤の原材料となる。

【0027】本発明におけるアミノ酸は光学活性体であってもラセミ体であってもよい。

【0028】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に説明する。

【0029】実施例1（S-フェニルカルバモイル-L-システインの合成）

Cys塩酸塩15.8g（0.1mol）をジメチルホルムアミド（DMF）1500mlに溶解し、これに0℃にてフェニルイソシアネート（C₆H₅NCO）13.10g（0.11mol）を滴下した後、20℃にて70時間放置した。

【0030】溶媒であるDMFを減圧留去し、粘性の残留物を傾斜によりエーテル100mlで数回洗浄を繰り返した。さらにエーテル100mlを加えて-8℃に一晩放置した。傾斜によりエーテルを除去し、減圧乾固した後、水160mlに溶解した。アンモニア水でpH6.5に調節すると沈殿物が生じ、再び4℃にて一晩放置した。析出した沈殿物を濾別し、冷水、アルコール/エーテル混合溶液にて洗浄後、減圧乾固してS-フェニルカルバモイル-L-システイン（Cys（Pc））を収量17.05g、収率72%で得た。

【0031】そのIRスペクトル（KBr-disk）は図1に示す通りで、690cm⁻¹にフェニル基による

5

吸収を確認できる。

【0032】実施例2 (S-フェニルカルバモイル-L-システインNCAの合成)

実施例1で得られたS-フェニルカルバモイル-L-システイン10g (4.2mmol) をテトラヒドロフラン (THF) 400ml に分散し、40~45℃で攪拌下トリクロルメチルクロロフォーマート (TCF) の分解によって得られたホスゲン (COCl₂) を通じた。分散物が溶解した時点を反応終了とし、減圧にて溶媒を留去した。

【0033】n-ヘキサンを残留物が浸る程度加え、0℃にて一晩放置した。傾斜によりn-ヘキサンを除去し、減圧乾固した。この残留物に酢酸エチル100mlを加えて溶解し、不純物を濾別し、濾液に過剰のn-ヘキサンを加えて結晶を析出させた。この結晶は粗NCAであり、酢酸エチル/n-ヘキサンにより再結晶を繰り返して精製を行った。得られたS-フェニルカルバモイル-L-システインNCA (Cys (Pc) NCA) は収量8.0gで、収率71%であった。

【0034】再結晶により得られたNCAの元素分析の結果は、次の通りであった。すなわち、S-フェニルカルバモイル-N-カルバモイル-L-システイン無水物 C₁₁H₁₀O₄N₂S としての計算値：C、49.62；H、3.79；N、10.52(%)、及び実測値：C、49.42；H、3.81；N、10.48(%)であった。また、m.p.157.0℃(分解)であった。IRスペクトルにてNCAの5員環の2個のカルボニル基の特性吸収は、1853及び1840cm⁻¹にみられた(図2)、これにより、S-フェニルカルバモイル-L-システインNCAができていることを確認した。

【0035】実施例3 (S-フェニルカルバモイル-L-システインNCAの単独縮重合)

S-フェニルカルバモイル-N-カルボキシー-L-システイン無水物0.92g (3.5mmol) はジクロロエタン (EDC) 17ml に溶解し、これに開始剤としてn-ブチルアミン1.3mg (0.018mmol、無水物に対して1/200倍モル) を加えた混合溶液を30℃で30.7時間放置した。

【0036】縮重合反応液をエーテル中に加えて生成ポリマーを析出させた。固液分離して得た固相をエーテルで洗浄し、減圧乾固した。ポリ-S-フェニルカルバモイル-L-システインを収量0.57g、収率73%で得た。

【0037】元素分析の結果は、次の通りであった。すなわち、得られたポリマーの計算値：C、54.04；H、4.53；N、12.60(%)、及び実測値：C、52.98；H、4.50；N、12.55(%)であった。このホモポリマーの粘度平均重合度は120であった。IRスペクトルにおいて、ポリマーの特性吸収を示すアミドIとIIの領域である1655及び15

6

25cm⁻¹に吸収がみられ、またフェニル基の吸収も690cm⁻¹にみられた(図3)。

【0038】実施例4 (S-フェニルカルバモイル-L-システインNCAの共重縮合)

S-フェニルカルバモイル-L-システインNCA 0.067g (0.25mmol)、L-アラニンNCA 0.138g (1.2mmol) 及びβ-メチル-L-アスパラギン酸NCA 0.614g (3.55mmol) をアセトニトリル (ACN) 37.5ml に溶解し、さらに開始剤であるn-ブチルアミン1.8mg (0.025mmol、無水物に対して1/200モル) を加えた混合溶液を30℃で33.6時間放置した。

【0039】縮重合反応により得られた沈殿物を濾過により単離し、少量のACN及びエーテルで洗浄し、減圧乾固してコポリマーを収量0.5g、収率83%で得た。

【0040】元素分析の結果は、次の通りであった。すなわち、得られたポリマーの計算値：C、47.81；H、5.61；N、12.27(%)、及び実測値：C、46.23；H、5.54；N、12.27(%)であった。IRスペクトルにおいて、ポリマーの特性吸収を示すアミドIとIIの領域である1650及び1530cm⁻¹に吸収がみられ、エステル基が付いているカルボニル基の特性吸収も1738cm⁻¹にみられた(図4)。また、NMRスペクトルから、3成分のアミノ酸の吸収がそれぞれ確認できた(図5)ことから、この高分子量ポリペプチドは3成分から成ることを確認した。

【0041】実施例5 (S-フェニルカルバモイル基の除去(その1))

実施例3で得られたS-フェニルカルバモイル基を側鎖に持つポリ (S-フェニルカルバモイル-L-システイン) 0.4g を0.5Nナトリウムエチラートのエチルアルコール溶液34ml に懸濁させ、室温にて15分間放置した。酢酸で中和後、さらにエチルアルコール30mlを加えて析出した沈殿物を濾過により単離し、アルコール/水で洗浄し、減圧固化して目的生成物を得た。

【0042】得られたポリマーの元素分析値は、計算値：C、34.93；H、4.89；N、31.09(%)、及び実測値：C、34.53；H、4.93；N、31.05(%)であった。IRスペクトルにおいて、ポリマーの特性吸収を示すアミドIとIIの領域である1648及び1520cm⁻¹に吸収がみられたが、690cm⁻¹にみられるフェニル基の特性吸収が消失していた(図6)。このように主鎖を切断することなくシステインの単独重合体を得ることができた。

【0043】実施例6 (S-フェニルカルバモイル基の除去(その2))

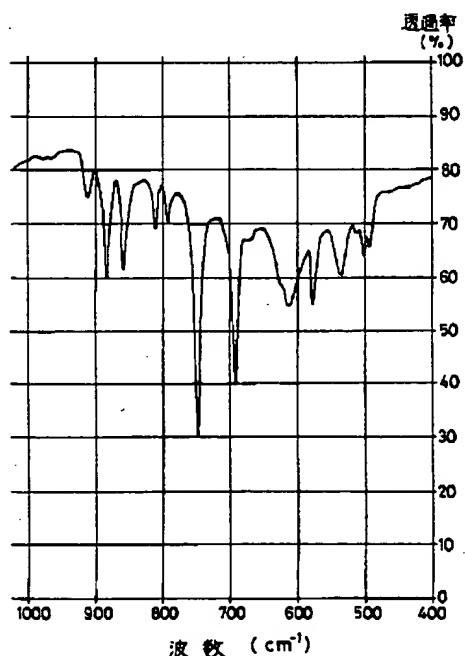
実施例4で得られたS-フェニルカルバモイル基を側鎖に持つコポリマー0.25g を0.5N水酸化ナトリウ

ム水溶液20mlに懸濁させ、室温にて80分間放置した。酢酸で中和後、得られた溶液を3日間透析（分子量1000以下のものを除去できるMw1000cut透析膜使用）した後、凍結乾燥して目的生成物0.19g（収率83%）を得た。

【0044】得られたポリマーの元素分析値は、計算値：C、42.88；H、4.85；N、13.48（%）、及び実測値：C、42.53；H、4.90；N、13.43（%）であった。このもののIRスペクトルにおいて、ポリマーの特性吸収を示すアミドIとI 10 Iの領域である1652及び1530 cm^{-1} に吸収がみられたが、690 cm^{-1} にみられるフェニル基の特性吸収および1738 cm^{-1} にみられるエステル基が付いているカルボニル基の特性吸収が消失していた（図7）。NMRスペクトル（図8）からも、この操作により同時に2種類の保護基（OMe基及びPc基）を切断できたことを確認できた。このように主鎖を切断することなくシステインの共重合体を得ることができた。

【0045】総じて、この処理により、L-システイン残基からフェニルカルバモイル基の外れたL-システイン、L-アラニン及びL-アスパラギン酸を成分とするコポリマーが得られたことは、元素分析、IRスペクトルおよびNMRスペクトルから確認できた。

【図1】



【0046】

【発明の効果】本発明によりSH基をフェニルカルバモイル基で保護したシステインのNCAを原料単量体として採用することにより、最終的にシステインの単独重合体又は共重合体を一般的な化学反応装置と技術とによりしかも安価に工業的に製造できるところとなった。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で得られた化合物のIRスペクトルを示す。

【図2】実施例2で得られた化合物のIRスペクトルを示す。

【図3】実施例3で得られた化合物のIRスペクトルを示す。

【図4】実施例4で得られた化合物のIRスペクトルを示す。

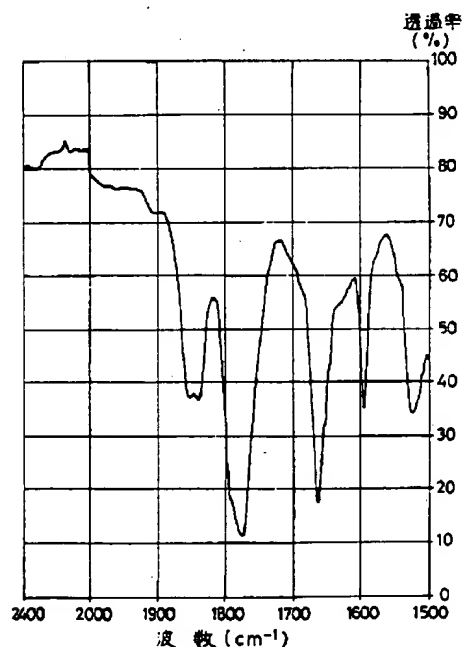
【図5】実施例4で得られた化合物のNMRスペクトルを示す。

【図6】実施例5で得られた化合物のIRスペクトルを示す。

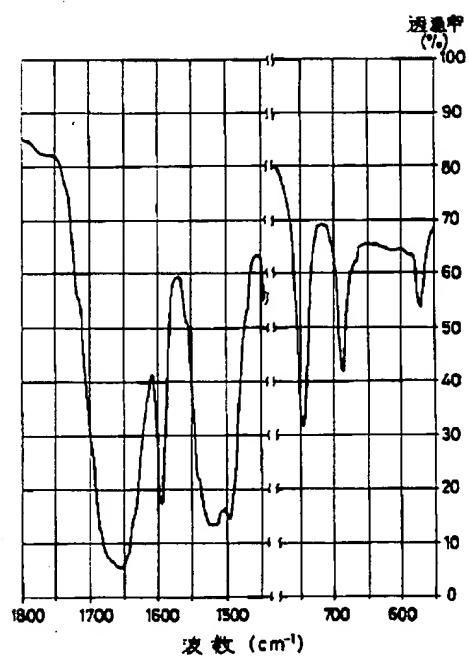
20 【図7】実施例6で得られた化合物のIRスペクトルを示す。

【図8】実施例6で得られた化合物のNMRスペクトルを示す。

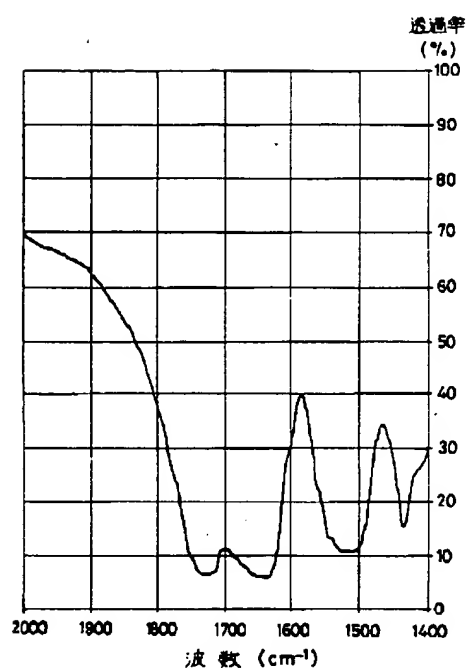
【図2】



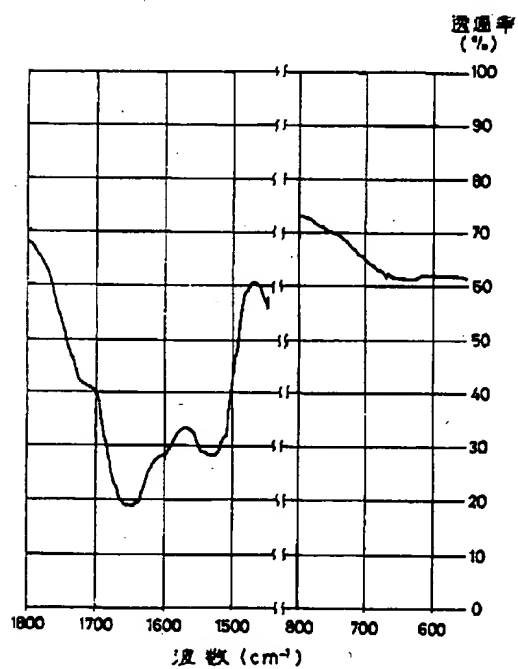
【図3】



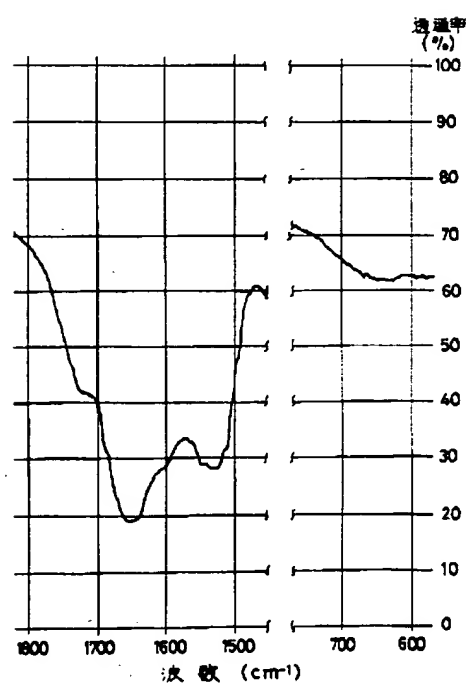
【図4】



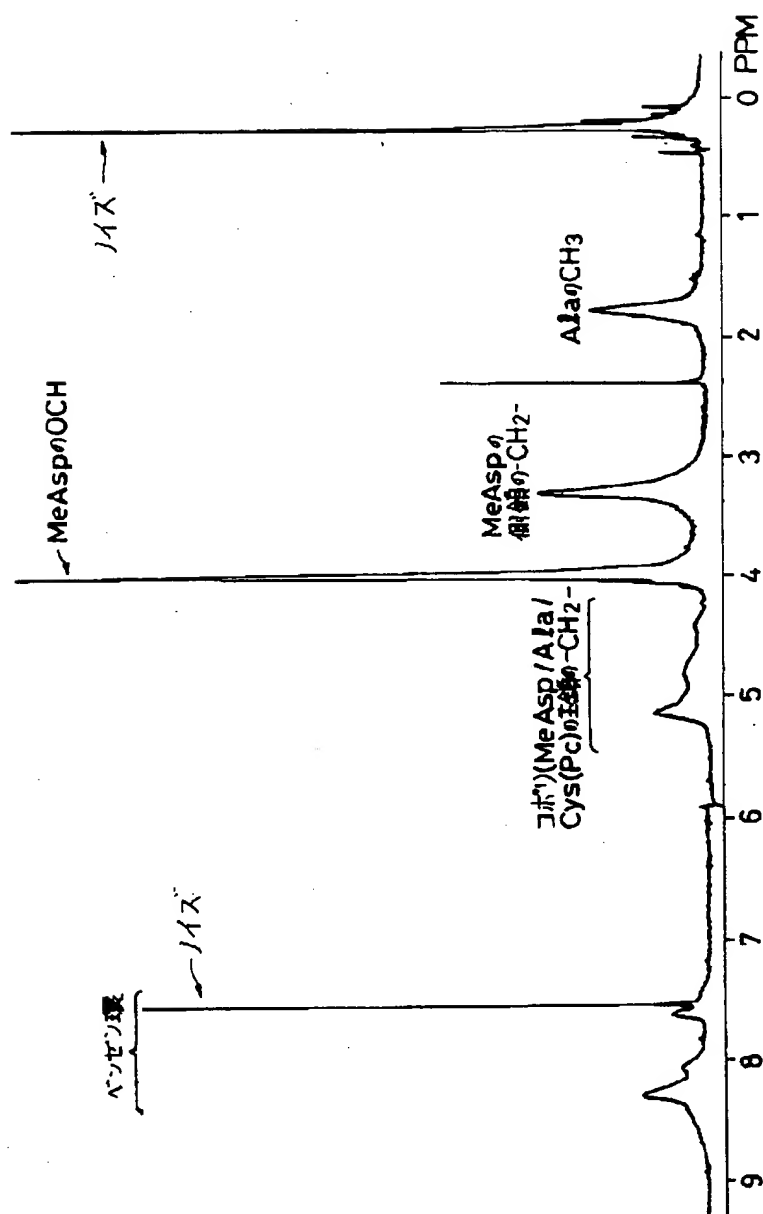
【図6】



【図7】



【図5】



【図8】

